

引用本文:张翠翠,李强.虎杖苷通过蛋白激酶B信号通路影响胃癌细胞增殖凋亡[J].安徽医药,2021,25(9):1708-1712.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.003.

◇ 药学研究 ◇



虎杖苷通过蛋白激酶B信号通路影响胃癌细胞增殖凋亡

张翠翠¹,李强²

作者单位:¹枣庄矿业集团枣庄医院消化内科,山东 枣庄 277100;

²枣庄市立医院消化内科,山东 枣庄 277100

摘要: **目的** 研究虎杖苷对胃癌细胞SGC-7901增殖和凋亡的影响和机制。**方法** 虎杖苷处理胃癌细胞SGC-7901,MTT法检测增殖,平板克隆实验检测克隆形成能力,碘化丙啶(PI)单染法检测细胞周期分布,膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染法检测细胞凋亡,蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)、Bcl-2相关X(Bax)、剪切型胱天蛋白酶-3(Cleaved-caspase-3)、磷酸化-蛋白激酶B(p-Akt)蛋白表达。用蛋白激酶B(Akt)信号激活剂和虎杖苷联合处理胃癌细胞SGC-7901,检测细胞增殖、克隆、周期、凋亡变化。**结果** 虎杖苷处理以后的胃癌细胞SGC-7901增殖能力下降[(0.58±0.06)比(0.20±0.01)],细胞克隆形成数目减少[(118.54±10.65)个比(69.52±7.91)个],细胞凋亡增多[(2.97±0.32)%比(17.45±1.69)%],细胞G0/G1比例升高[(50.47±3.25)%比(67.13±3.84)%],cyclin D1、CDK4蛋白表达减少,Bax、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平升高,p-Akt蛋白水平降低[(0.51±0.05)比(0.24±0.03)]。Akt信号激活剂处理可以逆转虎杖苷对胃癌细胞SGC-7901增殖、克隆抑制和周期阻滞、凋亡促进作用。**结论** 虎杖苷通过抑制Akt信号通路阻碍胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。

关键词: 虎杖; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 胃癌; 蛋白激酶B信号; 凋亡; 周期

Polydatin affects the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells through Akt signaling pathway

ZHANG Cuicui¹, LI Qiang²

*Author Affiliations:*¹Department of Gastroenterology, Zaozhuang Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277100, China; ²Department of Gastroenterology, Zaozhuang Municipal Hospital, Zaozhuang, Shandong 277100, China

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of polydatin on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** Polydatin was used to treat gastric cancer cell SGC-7901, MTT was used to detect proliferation, and plate cloning experiment was used to detect clone formation ability, cell cycle distribution was detected by PI single staining, apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining, and cyclin D1, CDK4, Bax, Cleaved-caspase-3 and p-Akt protein were detected by Western blotting. Gastric cancer cell line SGC-7901 was treated with Akt signaling activator combined with polydatin, and cell proliferation, cloning, cycle and apoptosis were detected. **Results** After treatment with polydatin, the proliferation of gastric cancer cells SGC-7901 decreased [(0.58±0.06) vs. (0.20±0.01)], the number of cell clones decreased [(118.54±10.65) vs. (69.52±7.91)], the apoptosis increased [(2.97±0.32)% vs. (17.45±1.69)%], the ratio of G0/G1 increased [(50.47±3.25)% vs. (67.13±3.84)%], the expression of cyclin D1 and CDK4 decreased, and the expression of Bax and Cleaved-caspase-3 elevated, p-Akt protein level were reduced [(0.51±0.05) vs. (0.24±0.03)]. Akt signal activator treatment could reverse the proliferation, clonal inhibition, cell cycle arrest and apoptosis promotion of polydatin in gastric cancer cell line SGC-7901. **Conclusion** Polydatin inhibits proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis by inhibiting Akt signaling pathway.

Key words: Fallopia japonica; Protein-serine-threonine kinases; Gastric cancer; Akt signal; Apoptosis; Cycle

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤,其严重影响着人类的生活质量,胃癌具有恶性程度高、易复发等特点,寻找有效的药物治疗胃癌是目前医学工作者研究的热点^[1]。虎杖苷是从虎杖中提取出来的芪类化合物,是白藜芦醇同葡萄糖的结合产物,虎杖

苷具有广泛的药理学作用,如平喘、镇咳、降低胆固醇等^[2]。以前的研究表明,虎杖苷能够抑制肿瘤生长,对于白血病、乳腺癌等肿瘤细胞具有抑制作用,并且可以诱导肿瘤细胞凋亡发生^[3-4]。虎杖苷抗肿瘤机制较为复杂,在研究虎杖苷诱导宫颈癌细胞凋

亡的实验研究中发现,其可以通过下调蛋白激酶B (Akt)信号通路的激活水平发挥抗肿瘤功效^[5]。目前对于虎杖苷在胃癌细胞增殖和凋亡中的作用和机制还不清楚。本次实验于2018年1月至2019年4月用虎杖苷处理体外培养的胃癌细胞,通过MTT法等多种实验技术手段探究虎杖苷对胃癌细胞增殖、克隆、周期、凋亡的作用和机制,为虎杖苷治疗胃癌的临床应用提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料 胃癌细胞SGC-7901购自南京科佰生物科技有限公司;周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)抗体、Bcl-2相关X(Bax)蛋白抗体购自美国Sigma-Aldrich;剪切型胱天蛋白酶-3(Cleaved-caspase-3)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;虎杖苷购自北京索莱宝科技有限公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;细胞周期蛋白D1(cyclin D1)抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology;磷酸化Akt(p-Akt)抗体购自美国Santa Cruz;Akt信号激活剂胰岛素样生长因子-1(IGF-1)购自美国Sigma。

1.2 MTT法测定虎杖苷处理后胃癌细胞增殖活性 胃癌细胞接种到96孔板中,分成两组,依次为对照组和虎杖苷组,虎杖苷组分成5个浓度梯度分别为2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$,对照组为0 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞培养48 h以后,分别在每个孔中添加10 μL 的噻唑蓝(MTT)溶液,继续放在37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育4 h。然后把孔内的液体弃掉,添加150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)溶液,震荡反应10 min。以不含细胞的空白孔调零,检测490 nm的吸光度。

1.3 平板克隆实验测定虎杖苷处理后胃癌细胞克隆形成能力 胃癌细胞按照对照组和虎杖苷分组每个孔中添加250个细胞接种到6孔板中,放在细胞培养箱中培养14 d。添加磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞,然后以4%的多聚甲醛溶液固定20 min。将甲醛弃掉,添加10%结晶紫染色30 min。在室温中晾干,在光学显微镜下观察并计数细胞克隆形成数目。随机选择5个实验,计算平均值。

1.4 PI单染法测定虎杖苷处理后胃癌细胞周期变化 收集培养处理48 h以后的对照组和虎杖苷组细胞,添加事先预冷后的PBS溶液,以1 000 g离心10 min。把上清吸除,然后添加50 μL 的PBS溶液,继续加入70%的乙醇,放在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应12 h。1 000 g离心10 min,吸弃上清,添加PI染色液500 μL ,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应30 min。流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.5 Annexin V-FITC/PI双染法测定虎杖苷处理后胃癌细胞凋亡变化 收集培养处理48 h以后的对照组和虎杖苷组细胞,以PBS将细胞洗涤2次,以250 μL 的结合缓冲液将细胞悬浮,细胞浓度为 1×10^6 个/毫升。收集1 mL细胞至流式管中,然后添加PI和Annexin V-FITC溶液各5 μL 到细胞中,放在避光条件下结合15 min。添加400 μL 的结合缓冲液,流式细胞仪检测凋亡。

1.6 蛋白质印迹法(Western blotting)测定虎杖苷处理后胃癌细胞中cyclin D1、CDK4、Bax、Cleaved-caspase-3、p-Akt蛋白水平 收集培养处理48 h以后的对照组和虎杖苷组细胞,在细胞中添加RIPA裂解试剂,放在冰上裂解20 min。然后根据BCA蛋白定量检测试剂盒测定蛋白的浓度。制备8%的分离胶以及5%的浓缩胶,按照每孔中加入40 μg 的蛋白样品上样,预染蛋白Marker上样量为5 μL 。在浓缩胶中设置80 V电压电泳,在分离胶中设置110 V电压电泳。将凝胶取出,以100 V电压转膜,将蛋白从凝胶上转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,转膜装置放在冰上操作。PVDF膜置于封闭液(5%牛血清白蛋白溶液)中,于室温孵育2 h。然后将PVDF膜放在一抗中,在低温4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育12 h。最后把PVDF膜放在1:2 000稀释以后的二抗反应液中,在室温中孵育2 h。将ECL超敏液滴加到PVDF膜上,以Bio-rad采集图像,分析蛋白灰度值。内参为GAPDH,分析目的蛋白表达水平。

1.7 Akt信号激活剂IGF-1对虎杖苷调控胃癌细胞增殖、克隆、周期、凋亡的影响 以含有3 $\mu\text{g/L}$ 的Akt信号激活剂IGF-1和6 $\mu\text{mol/L}$ 的虎杖苷细胞培养液培养胃癌细胞,设置为虎杖苷+IGF-1组,以虎杖苷组为对照,以上述MTT、平板克隆实验、PI单染、Annexin V-FITC/PI双染以及蛋白质印迹法检测细胞增殖、克隆、周期、凋亡和cyclin D1、CDK4、Bax、Cleaved-caspase-3、p-Akt蛋白水平。

1.8 统计学方法 数据用SPSS 21.0软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间比较经两独立样本 t 检验,多组差异比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

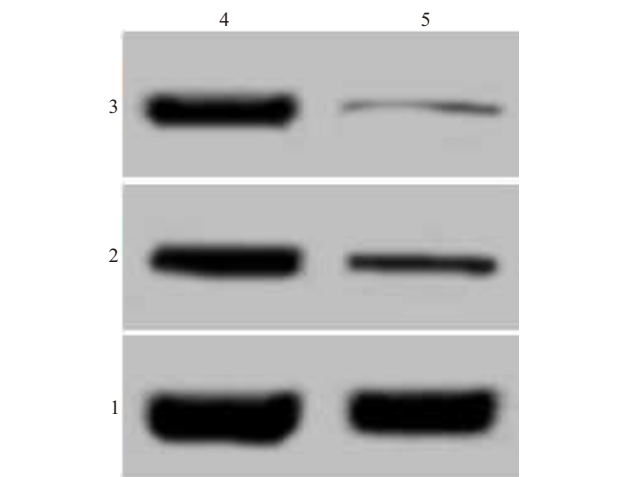
2 结果

2.1 虎杖苷抑制胃癌细胞增殖 对照组、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$ 虎杖苷组吸光度分别为(0.58 $\pm$ 0.06)、(0.45 $\pm$ 0.03)、(0.38 $\pm$ 0.03)、(0.31 $\pm$ 0.02)、(0.25 $\pm$ 0.02)、(0.20 $\pm$ 0.01), $F=166.429$, $P < 0.001$ 。胃癌细胞经过虎杖苷处理以后,细胞吸光度降低($P < 0.05$)。6 $\mu\text{mol/L}$ 的虎杖苷对胃癌细胞抑制率接近50%,后

续实验选用 6 $\mu\text{mol/L}$ 的虎杖苷处理胃癌细胞。

2.2 虎杖苷抑制胃癌细胞克隆形成并阻滞细胞周期

结果见表 1 和图 1, 胃癌细胞经过虎杖苷处理以后, 细胞克隆形成数目下降, G0/G1 细胞比例升高, 细胞中周期蛋白 cyclin D1、CDK4 表达水平下降。虎杖苷抑制胃癌细胞克隆形成并阻滞细胞周期。



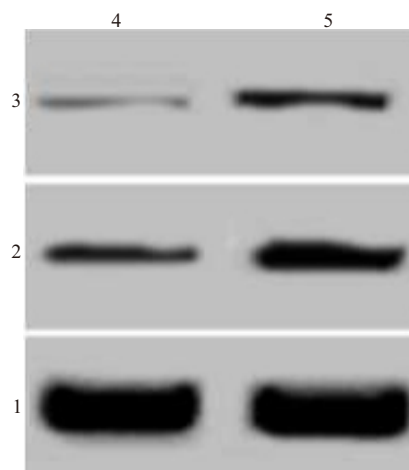
注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH); 2—CDK4; 3—cyclin D1; 4—对照组; 5—虎杖苷组。

图 1 蛋白质印迹法检测虎杖苷处理后胃癌细胞中细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)蛋白水平

2.3 虎杖苷诱导胃癌细胞凋亡 结果见图 2、图 3、表 2, 胃癌细胞经过虎杖苷处理以后, 细胞凋亡率升高, 细胞中凋亡蛋白 Bax、Cleaved-caspase-3 表达水平升高。虎杖苷诱导胃癌细胞凋亡。

2.4 虎杖苷抑制胃癌细胞中 Akt 信号通路激活 结果见图 4, 胃癌细胞经过虎杖苷处理以后, 细胞中 Akt 信号通路蛋白 p-Akt 水平降低 $[(0.51 \pm 0.05) \text{ 比 } (0.24 \pm 0.03), t=13.891, P<0.001]$ 。虎杖苷降低胃癌细胞中 Akt 信号通路激活水平。

2.5 Akt 信号激活剂 IGF-1 逆转虎杖苷对胃癌细胞增殖、克隆、周期、凋亡的影响 结果见图 5、图 6、表 3, Akt 信号激活剂 IGF-1 可以提高虎杖苷作用条件下胃癌细胞吸光度和克隆形成数目, 减少 G0/G1 期细胞比例, 减少细胞凋亡, 提高细胞中 cyclin D1、CDK4 蛋白表达水平, 减少细胞中 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白表达, 提高细胞中 p-Akt/Akt 水平。Akt



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH); 2—Bax; 3—Cleaved-caspase-3; 4—对照组; 5—虎杖苷组。

图 3 蛋白质印迹法测定虎杖苷处理后胃癌细胞中 Bcl-2 相关 X (Bax)、剪切型胱天蛋白酶-3 (Cleaved-caspase-3) 蛋白水平

表 2 虎杖苷处理后胃癌细胞凋亡率和 Bcl-2 相关 X (Bax)、剪切型胱天蛋白酶-3 (Cleaved-caspase-3) 蛋白水平 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	凋亡率/%	Cleaved-caspase-3	Bax
对照组	3	2.97 $\pm$ 0.32	0.23 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.05
虎杖苷组	3	17.45 $\pm$ 1.69	0.43 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.07
<i>t</i> 值		25.255	7.682	6.975
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

信号激活剂 IGF-1 逆转虎杖苷对胃癌细胞增殖、克隆、周期、凋亡的影响。

3 讨论

虎杖苷是从虎杖中提取出来的一种单体, 是一种羟基二苯乙烯类化合物, 国内外的研究显示, 虎杖苷可以加强心肌舒张及收缩功能、抑制血栓形成、改善微循环、降血脂, 对于结肠炎、子宫内膜异位症导致的疼痛也具有改善作用^[6-8]。虎杖苷具有肿瘤预防和治疗的作用, 其对于小鼠移植性肝癌具有抑制作用, 能够明显降低肺癌、宫颈癌等细胞生长速度^[5, 9-10]。本次实验显示, 虎杖苷处理后的胃癌增殖、克隆能力均下降, 提示虎杖苷可以抑制胃癌细胞增殖, 虎杖苷具有抗胃癌进展的作用。

本次实验还发现虎杖苷处理后的胃癌细胞 G0/G1 比例升高, 细胞凋亡增加, 说明虎杖苷可能通过

表 1 虎杖苷处理后胃癌细胞克隆形成数目、细胞周期分布以及细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 蛋白水平变化 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	克隆形成数目/个	细胞周期分布/%			cyclin D1	CDK4
			G0/G1	S	G2/M		
对照组	3	118.54 $\pm$ 10.65	50.47 $\pm$ 3.25	22.94 $\pm$ 1.36	26.59 $\pm$ 1.87	0.65 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.06
虎杖苷组	3	69.52 $\pm$ 7.91	67.13 $\pm$ 3.84	14.72 $\pm$ 1.23	18.15 $\pm$ 1.46	0.26 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04
<i>t</i> 值		11.085	9.935	13.448	10.635	15.363	8.737
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

颈癌细胞生长^[5]。Akt信号通路具有多种作用,在人体组织中广泛存在,对于细胞生长、凋亡等具有明显的调控功能^[16-18]。研究报道证实,肿瘤组织中存在Akt信号通路过度激活现象,而抑制Akt信号激活可以抑制肿瘤细胞的恶性生长^[19-20]。p-Akt是Akt的磷酸化形式,其水平升高是Akt信号激活的标志^[21]。本次实验显示,虎杖苷处理后的胃癌细胞中p-Akt水平降低,并且Akt信号激活剂可以逆转虎杖苷对胃癌细胞增殖、克隆抑制和细胞周期阻滞以及细胞凋亡促进作用,证实虎杖苷抗胃癌细胞恶性生物学行为机制与Akt信号有关。

总之,虎杖苷能够在体外抑制胃癌细胞的恶性生长、阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡,虎杖苷对于胃癌进展具有抑制作用,其作用机制与下调Akt信号激活水平有关。我们的结果为研究虎杖苷抗肿瘤机制提供了参考,为虎杖苷治疗胃癌的临床应用提供了理论资料。

(本文图2,5见插图9-1)

参考文献

- [1] FERRO A, MORAIS S, ROTA M, et al. Tobacco smoking and gastric cancer: meta-analyses of published data versus pooled analyses of individual participant data (StoP Project)[J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 2018, 27(3):197-204.
- [2] DI BENEDETTO A, POSA F, DE MARIA S, et al. Polydatin, natural precursor of resveratrol, promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(9): 944-952.
- [3] CHEN S, TAO J, ZHONG F, et al. Polydatin down-regulates the phosphorylation level of Creb and induces apoptosis in human breast cancer cell[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176501. DOI:10.1371/journal.pone.0176501.
- [4] CAO W J, WU K, WANG C, et al. Polydatin-induced cell apoptosis and cell cycle arrest are potentiated by Janus kinase 2 inhibition in leukemia cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3297-3302.
- [5] 潘纪红, 王海滨, 杜晓飞, 等. 虎杖苷通过PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导人宫颈癌细胞凋亡的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12): 2345-2349.
- [6] LIU W, CHEN P, DENG J, et al. Resveratrol and polydatin as modulators of Ca²⁺ mobilization in the cardiovascular system[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403(1): 82-91.
- [7] YAO J, WANG J Y, LIU L, et al. Polydatin ameliorates DSS-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor-kappaB activation[J]. *Planta Medica*, 2011, 77(5): 421-427.
- [8] INDRACCOLO U, INDRACCOLO SR, MIGNINI F. Micronized palmitoylethanolamide/trans-polydatin treatment of endometriosis-related pain: a meta-analysis[J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2017, 53(2): 125-134.
- [9] JIAO Y, WU Y, DU D, et al. Polydatin inhibits cell proliferation, invasion and migration, and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(4): e6867. DOI:10.1590/1414-431X20176867.
- [10] ZOU J, YANG Y, YANG Y, et al. Polydatin suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via NF- κ B pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108(10): 130-136.
- [11] ZHAO Y, FANG X, FANG H, et al. ATPR-induced G0/G1 phase arrest in gastric cancer cells by regulating the binding of 14-3-3 ϵ and filamin A[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(7): 3373-3384.
- [12] XIA R, SHENG X, XU X, et al. Hesperidin induces apoptosis and G0/G1 arrest in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 464-472.
- [13] ZHOU M, LIU X, LI Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4): 921-930.
- [14] GONG G, CAO Y, WANG F, et al. Planar chiral ferrocene cyclopalladated derivatives induce caspase-dependent apoptosis and antimetastasis in cancer cells[J]. *Organometallics*, 2018, 37(7): 1103-1113.
- [15] SILVA MACHADO FDA, MUNARI FM, SCARIOT FJ, et al. Piperlongumine induces apoptosis in colorectal cancer HCT 116 cells independent of Bax, p21 and p53 status[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6231-6236.
- [16] WANG P, LU Y C, WANG J, et al. Type 2 diabetes promotes cell centrosome amplification via AKT-ROS-dependent signalling of ROCK1 and 14-3-3 σ [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 47(1): 356-367.
- [17] HUANG F, SHI Q, LI Y, et al. HER2/EGFR - AKT signaling switches TGF β from inhibiting cell proliferation to promoting cell migration in breast cancer[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(21): 6073-6085.
- [18] CITI V, DEL RE M, MARTELLI A, et al. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 and mutations of PIK3CA and PTEN are predictive of breast cancer cell sensitivity to everolimus in vitro[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2018, 81(4): 745-754.
- [19] PAN H, LI T, JIANG Y, et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of miR-7 on gastric cancer via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(1): 440-446.
- [20] SOLBERG N T, WAALER J, LUND K, et al. Tankyrase inhibition enhances the antiproliferative effect of PI3K and EGFR inhibition, mutually affecting β -CATENIN and AKT Signaling in Colorectal Cancer[J]. *Molecular Cancer Research*, 2018, 16(3): 543-553.
- [21] DESAI S, BARAI A, BUKHARI AB, et al. α -Actinin-4 confers radioresistance coupled invasiveness in breast cancer cells through AKT pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(1): 196-208.

(收稿日期:2019-07-18,修回日期:2019-07-24)